ENZYME IN DEN INKUBATIONSLÖSUNGEN VON HIRNSCHNITTEN DES KANINCHENS.

INAUGURALDISSERTATION

zur Erlangung der Doktorwürde der

HOHEN MEDIZINISCHEN FAKULTÄT
DER UNIVERSITÄT DES SAARLANDES

vorgelegt von

Peter M. Schönberger

Saarbrücken

1972

Aus der Neurochirurgischen Klinik der Universität des Saarlandes

Direktor: Prof. Dr. med. F. Loew

ENZYME IN DEN INKUBATIONSLÖSUNGEN VON HIRNSCHNITTEN DES KANINCHENS.

Diaphorase, Glukose-6-phosphat-Dehydrogenase, Glycerin-1-phosphat-Dehydrogenase, Malat-Dehydrogenase, Sorbit-Dehydrogenase, Cholinesterase, Creatin-Phosphokinase, alkalische Phosphatase, saure Phosphatase, Glutamat-Oxalacetat-Transaminase.

I N A U G U R A L D I S S E R T A T I O N

zur Erlangung der Doktorwürde der

HOHEN MEDIZINISCHEN FAKULTÄT DER

UNIVERSITÄT DES SAARLANDES

vorgelegt von:

Peter M. Schönberger

1 9 7 1

Dekan: Professor Dr. med. H. Kulenkampff

Referent: Professor Dr. med. F. Loew

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Die mündliche Promotionsprüfung wurde am 10. 7. 1972 abgelegt

Inhaltsverzeichnis

		Seite
I.	Einleitung	4
II.	Darstellung der Versuche	10
1.	Methodik der Enzymbestimmungen	10
1.1	Präparation des Untersuchungsmaterials	10
1.2	Technik der manometrischen Versuche	12
1.3	Allgemeine Methodik der Aktivitätsbestimmungen	14
1.4	Diaphorase-Nachweis	17
1.5	Glukose-6-phosphat-Dehydrogenase-Nachweis	18
1.6	Glycerin-1-phosphat-Dehydrogenase-Nachweis	19
1.7	Malat-Dehydrogenase-Nachweis	20
1.8	Sorbit-Dehydrogenase-Nachweis	21
1.9	Cholinesterase-Nachweis	22
1.10	Creatin-Phosphokinase-Nachweis	23
1.11	Alkalische Phosphatase-Nachweis	24
1.12	Saure Phosphatase-Nachweis	25
1.13	Glutamat-Oxalacetat-Transaminase-Nachweis	26
2.	Ergebnisse der Enzymbestimmungen	27
2.1	Allgemeines zur Darstellung der Ergebnisse	27
2.2	Diaphorase-Aktivität	29
2.3	Glukose-6-phosphat-Dehydrogenase-Aktivität	29
2.4	Glycerin-1-phosphat-Dehydrogenase-Aktivität	29
2.5	Malat-Dehydrogenase-Aktivität	30
2.6	Sorbit-Dehydrogenase-Aktivität	31
2.7	Cholinesterase-Aktivität	32
2.8	Creatin-Phosphokinase-Aktivität	32
2.9	Alkalische Phosphatase-Aktivität	33
2.10	Saure Phosphatase-Aktivität	33
2.11	Glutamat-Oxalacetat-Transaminase-Aktivität	33
3.	Beziehungen zwischen der Inkubationszeit der Schnitte und der gefundenen Enzymaktivität	34
3.1	Methodik der manometrischen Versuche	34
3.2	Methodik der Inkubationen einer Sammelprobe	34
3.3	Laktat-Dehydrogenase-Nachweis	36
4.	Ergebnisse der Enzymbestimmungen nach verschiedenen Inkubationszeiten	37
4.1	Allgemeines zur Darstellung der Ergebnisse	37
4.2	Laktat-Dehydrogenase-Aktivitäten	39
4.3	Malat-Dehydrogenase-Aktivitäten	42

Seite

III. Besprechung der Befunde 45

1. Vergleich der Ergebnisse mit Enzymuntersuchungen RASMUSSENs und KLATZOs 45

2. Unterschiede zwischen den Enzymaktivitäten in den Inkubationslösungen gesunder und ödematöser Hirnschnitte 46

3. Einfluß der bei den WARBURG-Versuchen zugegebenen Substanzen auf die Enzymaktivitäten 47

4. Abhängigkeit der Enzymaktivitäten von der Inkubationsdauer der Schnitte 48

IV. Zusammenfassung 50

V. Schrifttumsverzeichnis 52

VI. Verzeichnis der Abkürzungen 57

I. Einleitung

Innerhalb einer Versuchsreihe, welche sich mit Unterschieden im Metabolismus ödematösen Hirngewebes im Vergleich zu gesundem Hirngewebe befaßt, wurde u. a. eine starke Steigerung der aeroben und anaeroben Glykolyse sowie ein leichter Anstieg der Atmung im Ödematösen nachgewiesen (H.-D. HERRMANN, J. DITTMANN).

Bei diesen WARBURG-Versuchen, die während drei Stunden abgelesen wurden, stellte sich die Frage, in welchem Maße das Untersuchungsmaterial in dieser Zeit bei der gewählten Versuchsanordnung verändert wird.

AEBI zeigte, daß im WARBURG-Versuch eine Parallele zwischen dem Übertritt stickstoffhaltiger Substanzen in das Inkubationsmilieu und der Schädigung inkubierter Leberschnitte besteht. Eine Quellung der Schnitte, abhängig von der Zusammensetzung der Inkubationslösung, beschleunigt den Übertritt. Außerdem bedeutet die Ausschwemmung von Gewebspartikeln aus den Schnittflächen einen Substanzverlust der Schnitte. Es wäre denkbar, daß die gemessenen Erhöhungen

der aeroben und anaeroben Glykolyse und des Sauerstoffverbrauchs auf ödematöser Seite nicht nur innerhalb der Schnitte ablaufen, sondern auch in der Inkubationsflüssigkeit, falls alle für die Glykolyse und Atmung notwendigen Enzyme in sie übergetreten sind.

Quellung und Proteinverlust lassen sich bei Leberschnitten durch die Wahl des Inkubationsmilieus weitgehend verhindern (AEBI). Da in unseren Versuchen Hirnschnitte das Ausgangsmaterial waren, kann dieses Ergebnis nicht ohne weiteres übernommen werden. Es wurde bereits nachgewiesen, daß trotz optimaler Inkubationsbedingungen mit Sicherheit mehrere glykolytische Enzyme aus Hirnschnitten in die Inkubationslösung übertreten (TRAUTMANN). Bedenkt man, daß bei ödemgeschädigten Hirnschnitten von Anfang an eine Desintegration des Gewebes ähnlich einer Quellung besteht, so ist zu erwarten, daß Inhaltsstoffe der Schnitte besonders leicht in die Inkubationslösung übertreten.

Aus seinen Untersuchungen folgerte AEBI, daß die Stickstoffabgabe von Gewebsschnitten als Test für die Schädi-

gung des Gewebes im WARBURG-Versuch gewertet werden kann. Eine Aufschlüsselung der stickstoffhaltigen Substanzen nahm er jedoch nicht vor. Durch die Untersuchungen TRAUTMANNs ist die Anwesenheit mehrerer glykolytischer Enzyme im Inkubationsmilieu von Hirnschnitten gesichert. In dieser Arbeit soll am Beispiel der Laktat-Dehydrogenase - sie wurde von TRAUTMANN in hohen Aktivitäten nachgewiesen - und einem Enzym, das bei Untersuchungen dieser Arbeit durch hohe Aktivität auffällt, geprüft werden, ob bei Inkubation von Hirnschnitten eine Zeitabhängigkeit der Enzymabgabe vorhanden ist; desgleichen, ob durch Ödem vorgeschädigte Hirnsubstanz einen größeren Enzymverlust zeigt als gesundes Gewebe. Möglicherweise sind alle Substanzabgaben auf gesunder wie auf ödematöser Seite von der Inkubationszeit abhängig. WARBURG-Versuche sollten daher innerhalb einer Frist ablaufen, in der keine Artefakte des eingesetzten Materials zu erwarten sind.

Nach Versuchen an Katzenhirnen (RASMUSSEN und KLATZO) liegen in der ödemgeschädigten weißen Hirnsubstanz die

Aktivitäten der Laktat-Dehydrogenase und Diaphorase unter den Aktivitäten der Kontrollen, hingegen Glukose-6-phosphat-Dehydrogenase und Glycerin-1-phosphat-Dehydrogenase darüber. Die Laktat-Dehydrogenase-Aktivität des Liquors von Katzen mit Hirnödemen ist dagegen gegenüber Liquorproben von Kontrolltieren erhöht. Succinat-Dehydrogenase, Creatin-Phosphokinase, alkalische Phosphatase, Adenosin-tri-Phosphatase, Glutamat-Oxalacetat-Transaminase, NADP-abhängige Isocitrat-Dehydrogenase zeigen in der weißen Hirnsubstanz normale Aktivität. Trotz vieler weiterer Arbeiten (DAVIES-JONES; DITTMANN; KLUGE; RASMUSSEN und KLATZO; SITZMANN; WIECHERT und BRETSCHNEIDER; WOLNITZ, JACOBS, CHRISTOFF, SOLOMON, CHERNIK; TSCHANKOW und DIKOW; BUCKELL, CROMPTON, ROBERTSON, BARNES; HELLER und HOLSTEIN; Übersichten siehe BERGMEYER; DOCUMENTA GEIGY; SCHMIDT) zum Ausbau einer Liquorenzym-Diagnostik sind bisher nur wenige Enzyme mit erhöhter Aktivität im Liquor festgestellt worden, und auch da sind Relationen zwischen Aktivitätsverschiebung und Gewebealteration nicht ausreichend geklärt.

Im Zusammenhang unserer Arbeit ist interessant, ob Enzyme aus den Versuchen RASMUSSENs und KLATZOs im Inkubationsmilieu gefunden werden und ob analoge Unterschiede vom Gesunden zum Ödematösen nachweisbar sind, zumal zumindest äußerlich eine Ähnlichkeit im System Liquor - Hirnödem zum System Inkubationslösung - Inkubationsschnitte auffällt. Mit Sicherheit kann man jedoch behaupten, daß Enzyme, die in unseren Proben nicht auftauchen, niemals im normalen oder pathologischen Liquor nachweisbar sind.

Aus den geschilderten Ergebnissen und Erwägungen ergeben sich folgende Fragestellungen:

1. Sind die Enzyme Diaphorase, Glukose-6-phosphat-Dehydrogenase, Glycerin-1-phosphat-Dehydrogenase, Malat-Dehydrogenase, Sorbit-Dehydrogenase, Cholinesterase, Creatin-Phosphokinase, Alkalische Phosphatase, Saure Phosphatase, Glutamat-Oxalacetat-Transaminase in den Inkubationsflüssigkeiten nachweisbar?

2. Was zeigt ein Vergleich zwischen Aktivitäten, die von RASMUSSEN und KLATZO und in dieser Arbeit mit dem gleichen Enzym gemessen wurden?

3. Sind Enzymaktivitäten in den Inkubationslösungen gesunder und ödematöser Hirnschnitte unterschiedlich?

4. Besteht eine Beziehung zwischen der Inkubationszeit von Hirnschnitten und der in den Inkubationslösungen nachgewiesenen Aktivitäten von Laktat-Dehydrogenase und einem weiteren Enzym, das in unseren Untersuchungen durch hohe Aktivität auffällt.

II. DARSTELLUNG DER VERSUCHE

1. Methodik der Enzymbestimmungen

1.1 Präparation des Untersuchungsmaterials

Die Versuche wurden an ausgewachsenen Kaninchen von 2 bis 3 kg Gewicht ohne Berücksichtigung der Rasse oder des Geschlechts durchgeführt.

Das Hirnödem wurde durch ein Kältetrauma hervorgerufen. Ohne Prämedikation wurde unter Lokalanästhesie die rechte vordere Schädelhälfte freigelegt. Eine quadratische Trepanation von 11 mm Kantenlänge wurde derart ausgeführt, daß die Kranznaht im vorderen Drittel des Fensters lag. Die Öffnung reichte bis zum Rand der Orbita und bis auf 2 mm an die Mittellinie heran. Es wurde darauf geachtet, daß die Dura unversehrt blieb. Ein quadratischer Kupferstempel wurde auf -70° C gekühlt und 30 Sekunden lang auf die Dura gedrückt (Kantenlänge des Kupferstempels: 10 mm). Danach wurde durch häufiges Spülen mit Wasser erwärmt. Nach Bestreuen mit Nebacetin^{R}-Puder zur Vermeidung einer Infektion wurde die Wunde geschlossen. Nach genau 24 Stunden

wurden die Tiere durch Luftembolie getötet. Bei keinem der Tiere fand sich eine Infektion der Wunde. Nach Abtragung der Schädelknochen wurde die Dura geöffnet, das Großhirn entnommen und in ein Gefäß mit eiskalter Inkubationslösung (nachfolgend K-Lösung genannt) gegeben. In einer gekühlten Petrischale wurden die Arachnoidea, die Pia und die corticalen Gefäße sorgfältig entfernt. Die Stelle der Kälteeinwirkung war stets nekrotisch. Das occipital angrenzende Hirn wurde in einem 5 mm breiten Streifen bis zum medialen Sulcus und dem Ventricel entnommen. Es wurde darauf geachtet, daß der entnommene Schnitt frei von nekrotischen oder blutigen Bestandteilen war. Nachdem die gesamte an die Ventricel angrenzende weiße Substanz entfernt worden war, wurde der Schnitt zum Wägen und Messen des Wassergehalts sowie zur Stoffwechseluntersuchung in zwei Teile zerlegt. Ein in Abmessungen und Topografie möglichst genau entsprechender Kontrollschnitt wurde aus der ungeschädigten Hemisphäre entnommen und untersucht. In einer gekühlten Petrischale wurden die Hirnproben mit einem Skalpell in Scheiben

von maximal 0,3 mm Dicke und maximal 1 mm Länge geschnitten, wobei die Schnittrichtung so senkrecht wie möglich zur Rinde verlief. Jeder Schnitt wurde sofort in eine gekühlte Inkubationsflüssigkeit gegeben.

1.2 Technik der manometrischen Versuche

Ab dem Zeitpunkt, da das Großhirn entnommen worden war, befand sich das Untersuchungsmaterial in K-Lösung folgender Zusammensetzung:

Na^+	133,4	mM
K^+	5,0	mM
Ca^{++}	2,5	mM
Mg^{++}	0,8	mM
Cl^-	115,7	mM
HCO_3^-	25,0	mM
HPO_4^{--}	1,2	mM
$H_2PO_4^-$	0,3	mM
SO_4^{--}	0,8	mM
D-Glukose	5,0	mM

In einer Lösung gleicher Zusammensetzung wurden die Schnitte später inkubiert. Atmung und CO_2-Produktion wurden bei 38° C nach der letzten manometrischen Zweigefäß-Methode nach WARBURG in Kegelgefäßen mit großem Anhänger und Birne (BRAUN MELSUNGEN Best. Nr. 73305) gemessen.

Hauptraum: 3,0 ml Inkubationslösung

Anhanggefäß I: 3,0 ml Aqua dest.

Anhanggefäß II: 2,9 ml 3 M $KHCO_3$ - K_2CO_3 -Puffer (79-21)
0,1 ml wässrige Lösung von 2 mg Karboanhydrase

Zu Beginn des Experiments wurden die Gefäße 10 Minuten lang im Thermostaten bei 38° C mit einer Mischung aus 75 % N_2, 20 % O_2 und 5 % CO_2 begast.

Sofort nach den letzten Manometerablesungen wurden die Schnitte zusammen mit der Inkubationslösung mit kleinen, gekrümmten Glasröhren mittels Gummibällchen aus den Gefäßen genommen. Dann wurden die Schnitte während 10 Minuten bei 3 000 · g zentrifugiert. Nach Abgießen des klaren Überstandes und bestmöglichem Trocknen des Glases

wurde das Gewicht der frischen Schnitte jedes Gefäßes bestimmt. Nach einer Trockenzeit von etwa 15 Stunden bei 105° C wurden sie wieder gewägt. Die überstehenden klaren Lösungen wurden bis zur Durchführung der Enzymaktivitätsbestimmungen bei - 40° C gelagert.

1.3 Allgemeine Methodik der Aktivitätsbestimmungen

Bei der Aktivitätsmessung der Enzyme wurden die allgemeinen Vorschriften beachtet (BERGMEYER, HESS und BRAND). Bei Cholinesterase wurde die Originalvorschrift von MERCK verwendet. Bei Glukose-6-phosphat-Dehydrogenase, Malat-Dehydrogenase, Sorbit-Dehydrogenase, Creatin-Phosphokinase, alkalischer Phosphatase, saurer Phosphatase und Glutamat-Oxalacetat-Transaminase wurden Originalpackungen von BOEHRINGER, Mannheim, benutzt. Diaphorase und Glycerin-1-phosphat-Dehydrogenase wurden nach den Originalvorschriften bestimmt, die BOEHRINGER für die Aktivitätsbestimmung reiner Enzympräparate anwendet

(Biochemika-Katalog CF BOEHRINGER, Mannheim, Ausgaben Oktober 1970 und Juni 1967). Geändert wurden gegenüber diesen Vorschriften nur die Volumina der untersuchten Proben. An Stelle von 0,02 ml der bei BOEHRINGER eingesetzten reinen Enzympräparate wurden jeweils 0,50 ml Probe verwendet. Zum Ausgleich wurden andere Testlösungen in geringerer Menge, aber derartig erhöhter Konzentration genommen, daß die Endkonzentrationen in den Reaktionsansätzen unverändert blieben.

Alle Messungen wurden mit einem EPPENDORF-Photometer mit temperiertem Küvettenhalter durchgeführt. Glasküvetten von 1 cm Schichtdicke, Wellenlänge 334 nm, Photozelle 90 b, Temperatur 25° C, bei saurer und alkalischer Phosphatase 37° C. Die bei 40° C gelagerten Proben wurden grundsätzlich vor jeder Messung 10 Min. bei ca. 3 000 · g zentrifugiert und vom Niederschlag dekantiert.

Das verwendete Wasser war in einer Glasapparatur mit

elektrischer Heizschlange aus Metall destilliert worden. Pipetten und Küvetten wurden mit Chromschwefelsäure und destilliertem Wasser gereinigt, Pipetten wurden während der Messungen auf gläsernen Gestellen gelagert.

1.4 Diaphorase-Nachweis

Test-Prinzip:

6,8-Dithio-n-octat+NADH+H^{+} $\xrightarrow{\text{Diaphorase}}$ NAD^{+}+6,8 - Dihydrodithio-n-octat

	Reagenzlösungen		Reaktionsgemisch	
Substanz	Konzentration mg/ml	Molarität mM	Testlösung ml	Endmolarität mM
KH_2PO_4	14,74	108,32		72,22
Na_2HPO_4	2,10	11,77	2,00	7,85
NAD	0,30	0,39		0,26
EDTA	0,50	1,34		0,90
NADH	10,00	10,87	0,05	0,18
Lipoat	15,00	71,98	0,20	4,80
Albumin Lsg	8,00		0,25	
Probe			0,50	

Mess-Methode:

Es wurde 3 Minuten lang in 1-Minuten-Intervallen E gemessen. Start mit 0,2 ml Lipoat, anschließend Messung der Abnahme der Extinktion während 3 Minuten in 1-Minuten-Intervallen.

1.5 Glukose-6-phosphat-Dehydrogenase-Nachweis

Test-Prinzip:

$$G\text{-}6\text{-}P + NADP^+ \xrightarrow{G\text{-}6\text{-}PDH} \text{Glukonat-6-P} + NADPH + H^+$$

Reagenzlösungen		Reaktionsgemisch	
Substanz	Molarität mM	Testlösung ml	Endmolarität mM
Triäthanol-aminpuffer pH 7,5	50,00	3,00	46,15
Äthylendi-amintetra-acetat	5,00		4,62
NADP	10,00	0,10	0,31
Glukose-6-phosphat	31,00	0,05	0,48
Probe		0,10	

Mess-Methode:

Es wurde 3 Minuten lang in 1-Minuten-Intervallen E gemessen. Start mit 0,05 ml Glukose-6-phosphat, anschließend Messung der Zunahme der Extinktion während 3 Minuten in 1-Minuten-Intervallen.

1.6 Glycerin-1-phosphat-Dehydrogenase-Nachweis

Test-Prinzip:

$$\text{Dihydroxyaceton-P} + \text{NADH} + \text{H}^+ \xrightarrow{\text{GDH}} \text{Glycerin-1-P} + \text{NAD}^+$$

	Reagenzlösungen		Reaktionsgemisch	
Substanz	Konzentration mg/ml	Molarität mM	Testlösung ml	Endmolarität mM
Triäthanol-aminpuffer pH 7,6	66,85	360,00	2,40	288,00
Dihydroxy-acetonphos-phat	8,00	18,31	0,05	0,31
NADH	10,00	10,88	0,05	0,18
Probe			0,50	

Mess-Methode:

Es wurde 3 Minuten lang in 1-Minuten-Intervallen E gemessen. Start mit 0,05 ml Dihydroxyacetonphosphat, anschließend Messung der Abnahme der Extinktion während 3 Minuten in 1-Minuten-Intervallen.

1.7 Malat-Dehydrogenase-Nachweis

Test-Prinzip:

$$\alpha\text{-Ketoglutarat} + \text{L-Aspartat} \xrightarrow{\text{GOT}} \text{L-Glutamat} + \text{Oxalacetat}$$

$$\text{Oxalacetat} + \text{NADH} + \text{H}^+ \longrightarrow \text{L-Malat} + \text{NAD}^+$$

	Reagenzlösungen		Reaktionsgemisch	
Substanz	Konzentration mg/ml	Molarität mM	Testlösung ml	Endmolarität mM
Phosphat-puffer pH 7,4		100	3,00	92,02
Aspartat		42		38,76
α-Ketoglutarat		65	0,05	1,0
NADH			0,05	0,18
GOT	0,10		0,05	
Probe			0,10	

Mess-Methode:

Es wurde 3 Minuten lang in 1-Minuten-Intervallen E gemessen. Start mit 0,10 ml Probe, anschließend Messung der Abnahme der Extinktion während 3 Minuten in 1-Minuten-Intervallen.

1.8 Sorbit-Dehydrogenase-Nachweis

Test-Prinzip:

$$\text{D-Fruktose} + \text{NADH} + \text{H}^+ \xrightarrow{\text{SDH}} \text{D-Sorbit} + \text{NAD}^+$$

Reagenzlösungen		Reaktionsgemisch	
Substanz	Molarität mM	Testlösung ml	Endmolarität mM
Triäthanol-aminpuffer pH 7,4	200,00	2,00	123,08
NADH	15,00	0,05	0,23
Fruktose	1650,00	0,20	101,54
Probe		1,00	

Mess-Methode:

Es wurden die Extinktionen E 1 und E 2 im Abstand von 10 Minuten gemessen. Start mit 0,20 ml Fruktose, anschließend Messung der Extinktionsabnahme eines 10-Minuten-Intervalls.

1.9 Cholinesterase-Nachweis

Test-Prinzip:

S-Butyrylthiocholinjodid $\xrightarrow{CHE}$ Thiocholin+Butyrat

Thiocholin + 5,5 Dithiobis-2-nitrobenzoat ⟶ 5-Mercapto-2-nitrobenzoat

Reagenzlösungen		Reaktionsgemisch	
Substanz	Molarität mM	Testlösung ml	Endmolarität mM
Phosphatpuffer pH 7,7	20,00	2,00	18,96
5,5 Dithiobis-2-nitrobenzolsäure	0,25		0,24
Butyrylthiocholinjodid	120,00	0,10	5,69
Probe		0,01	

Mess-Methode:

Start mit 0,01 ml Probe. Nach einer Wartezeit von 30 - 60 sec wurde die Zeit gestoppt, in der die Extinktion um 0,100 zunahm.

1.10 Creatin-Phosphokinase-Nachweis

Test-Prinzip:

$$\text{Creatin} + \text{ATP} \xrightarrow{\text{CPK}} \text{Creatin-P} + \text{ADP}$$

$$\text{ADP} + \text{PEP} \xrightarrow{\text{PK}} \text{ATP} + \text{Pyruvat}$$

$$\text{Pyruvat} + \text{NADH} + \text{H}^+ \longrightarrow \text{L-Lactat} + \text{NAD}^+$$

	Reagenzlösungen		Reaktionsgemisch	
Substanz	Konzentration mg/ml	Molarität mM	Testlösung ml	Endmolarität mM
Glycinpuffer pH 9,0		2000,00		400,00
NADH		1,00		0,20
ATP		6,00	0,70	1,20
PEP		2,00		0,40
LDH	2,00			
PK	2,00		0,05	
$Mg\ Cl_2$		500,00		7,14
Glycinpuffer pH 9,0		100,00		50,00
Creatin		63,00	1,75	31,50
Probe			1,00	

Mess-Methode:

Es wurden die Extinktionen E 1 und E 2 im Abstand von 10 Minuten gegen einen Leerwert gemessen. Start mit 1,75 ml Creatin in Glycinpuffer, anschließend Messung der Extinktionsabnahme eines 10-Minuten-Intervalls gegen einen Leerwert.

1.11 Alkalische Phosphatase-Nachweis

Test-Prinzip:

p-Nitrophenyl-P $H_2O \xrightarrow{AP}$ p-Nitrophenol + P_1

Reagenzlösungen		Reaktionsgemisch	
Substanz	Molarität mM	Testlösung ml	Endmolarität mM
Glycinpuffer pH - 10,5	50,00		45,45
Mg Cl_2	0,50	1,00	0,45
Natrium-p-nitrophenyl-phosphat	5,50		5,00
Probe		0,10	

Mess-Methode:

Es wurde die Extinktionszunahme eines 30-Minuten-Intervalls gemessen. Start mit 0,10 ml Probe; nach einer Inkubationsdauer von genau 30 Minuten bei 37° C wurde die Reaktion durch Zugabe von Natronlauge unterbrochen. Die abgelesene Extinktion wurde auf den Leerwert bezogen.

1.12 Saure Phosphatase-Nachweis

Test-Prinzip:

$$\text{p-Nitrophenyl-P} + H_2O \xrightarrow{SP} \text{p-Nitrophenol} + P_1$$

Reagenzlösungen		Reaktionsgemisch	
Substanz	Molarität mM	Testlösung ml	Endmolarität mM
Citratpuffer pH 4,8	50,00	1,00	41,67
Natrium-p-nitrophenyl-phosphat	50,00		41,67
Probe		0,20	

Mess-Methode:

Es wurde die Extinktionszunahme eines 30-Minuten-Intervalls gemessen. Start mit 0,20 ml Probe. Nach einer Inkubationsdauer von genau 30 Minuten bei 37° C wurde die Reaktion durch Zugabe von Natronlauge unterbrochen. Die abgelesene Extinktion wurde auf den Leerwert bezogen.

1.13 Glutamat-Oxalacetat-Transaminase-Nachweis

Test-Prinzip:

$$\alpha\text{-Ketoglutarat} + \text{L-Aspartat} \xrightarrow{\text{GOT}} \text{L-Glutamat} + \text{Oxalacetat}$$

$$\text{Oxalacetat} + \text{NADH} + \text{H}^+ \xrightarrow{\text{MDH}} \text{L-Malat} + \text{NAD}^+$$

	Reagenzlösungen		Reaktionsgemisch	
Substanz	Konzentration mg/ml	Molarität mM	Testlösung ml	Endmolarität mM
Phosphatpuffer pH = 7,4		100,00	3,00	81,08
L-Aspartat		40,00		32,43
MDH	25,00		0,05	
LDH	25,00			
NADH		12,00	0,05	0,16
Ketoglutarat		250,00	0,10	6,76
Probe			0,50	

Mess-Methode:

Es wurde 3 Minuten lang in 1-Minuten-Intervallen E gemessen. Start mit 0,10 ml Ketoglutarat, anschließend Messung der Abnahme der Extinktion während 3 Minuten in 1-Minuten-Intervallen.

2. Ergebnisse der Enzymbestimmungen

2.1 Allgemeines zur Darstellung der Ergebnisse

Von jedem der manometrischen Versuche lagen vier Probenpaare vor, zwei Paare von der ungeschädigten und zwei Paare von der ödematösen Hemisphäre, wobei jeweils zur Hälfte aller Gefäße eines Versuches eine Substanz zugegeben worden war. Es handelt sich dabei um Arzneimittel, Hemmstoffe oder Aktivatoren des Stoffwechsels sowie Intermediärprodukte des Glukosestoffwechsels.

In den folgenden Tabellen sind die Ergebnisse entsprechend der Anordnung unserer manometrischen Versuche aufgeschlüsselt. Dabei ist jeweils der Mittelwert von zwei zusammengehörigen Bestimmungen, von denen jede einzelne das mittlere Ergebnis von Doppelmessungen darstellt, unter Zusatz der mittleren Streuung angegeben. Neben der Versuchsnummer ist in der Tabelle auch angegeben, welche Substanz jeweils zugegeben worden war. Alle Ergebnisse sind in "Milli-

einheiten pro mg Trockensubstanz" ($\frac{mU}{mgTrs}$) angegeben.

Eine Einheit entspricht der Enzymaktivität, die bei 25° C bei optimalen Reaktionsbedingungen pro Minute ein µ-Mol Substrat umsetzt. Die rechnerische Auswertung der Messergebnisse erfolgt nach folgender allgemeiner Formel:

$$\frac{E}{t} \cdot \frac{V \cdot V_i}{V_p \cdot Trs} \cdot \frac{1000}{6} = \frac{m\ U}{mg\ Trs}\ (334\ nm)$$

E = die gemessene Extinktionsänderung

t = Zeit in Minuten, in der E gemessen wurde

V = Gesamtvolumen in der Küvette

V_i = Volumen der Inkubationslösung

V_p = Volumen der eingesetzten Probe

Trs = Trockensubstanz in Milligramm der inkubierten Hirnprobe

2.2 Diaphorase-Aktivität

Die Extinktionen aller untersuchten Proben blieben während der gesamten Ablesungszeit konstant. Diaphorase-Aktivität war nicht nachweisbar.

2.3 Glukose-6-phosphat-Dehydrogenase-Aktivität

Die Extinktionen aller untersuchten Proben blieben während der gesamten Ablesungszeit konstant. Glukose-6-phosphat-Dehydrogenase-Aktivität war nicht nachweisbar.

2.4 Glycerin-1-phosphat-Dehydrogenase-Aktivität

Die Extinktionen aller untersuchten Proben blieben während der gesamten Ablesungszeit konstant; es war keine Glycerin-1-phosphat-Dehydrogenase nachweisbar.

2.5 Malat-Dehydrogenase-Aktivität

Versuch G 2

	Ungeschädigte Hemisphäre	Ödematöse Hemisphäre
Kontrolle	176 ± 55	199 ± 33
Venoruton	197 ± 15	216 ± 18

Versuch G 8

	Ungeschädigte Hemisphäre	Ödematöse Hemisphäre
Kontrolle	263 ± 52	277 ± 22
Dihydroxyaceton	257 ± 32	265 ± 19

Versuch E 7

	Ungeschädigte Hemisphäre	Ödematöse Hemisphäre
Kontrolle	254 ± 66	294 ± 5
Natriumlaktat	197 ± 37	286 ± 0

Versuch E 8

	Ungeschädigte Hemisphäre	Ödematöse Hemisphäre
Kontrolle	315 ± 42	252 ± 35
Natriumlaktat	329 ± 14	368 ± 31

Versuch D 9

	Ungeschädigte Hemisphäre	Ödematöse Hemisphäre
Kontrolle	184 ± 14	181 ± 1
Hypoglycin	185 ± 9	211 ± 13

Versuch B 6

	Ungeschädigte Hemisphäre	Ödematöse Hemisphäre
Kontrolle	231 ± 42	303 ± 33
Helfergin	204 ± 10	253 ± 35

2.6 Sorbit-Dehydrogenase-Aktivität

Versuch D 4

	Ungeschädigte Hemisphäre	Ödematöse Hemisphäre
Kontrolle	63,3 ± 9,4	81,3 ± 0
Fruktose-1-Phosphat	110,8 ± 0,4	108,0 ± 2,0

Versuch D 8

	Ungeschädigte Hemisphäre	Ödematöse Hemisphäre
Kontrolle	28,1 ± 7,8	34,6 ± 9,8
Nicotinsäureamid	28,1 ± 2,6	29,3 ± 5,6

2.7 Cholinesterase-Aktivität

Versuch A 3

	Ungeschädigte Hemisphäre	Ödematöse Hemisphäre
Kontrolle	1,4 ± 0,1	1,0 ± 0,2
Insulin	1,5 ± 0,1	1,2 ± 0,2

Versuch A 4

	Ungeschädigte Hemisphäre	Ödematöse Hemisphäre
Kontrolle	0,9 ± 0,2	0,5
Insulin	0,8 ± 0,1	1,0 ± 0,2

2.8 Creatin-Phosphokinase-Aktivität

Versuch B 5

	Ungeschädigte Hemisphäre	Ödematöse Hemisphäre
Kontrolle	64,3 ± 8,7	45,4 ± 4,0
Helfergin	59,7 ± 7,3	52,7 ± 3,1

Versuch E 3

	Ungeschädigte Hemisphäre	Ödematöse Hemisphäre
Kontrolle	51,2 ± 17,1	62,4 ± 1,9
Adenosindiphosphat	51,4 ± 0,9	59,1 ± 4,3

Versuch E 9

	Ungeschädigte Hemisphäre	Ödematöse Hemisphäre
Kontrolle	42,5 ± 2,0	46,9 ± 3,5
Milchsäure	37,9 ± 0,7	39,5 ± 2,9

2.9 Alkalische Phosphatase-Aktivität

Die Extinktionen der untersuchten Proben lagen alle innerhalb der Streuung des Leerwertes; alkalische Phosphatase war nicht nachweisbar.

2.10 Saure Phosphatase-Aktivität

Die Extinktionen der untersuchten Proben lagen alle im Bereich der Streuung des Leerwertes, es war keine saure Phosphatase nachweisbar.

2.11 Glutamat-Oxolacetat-Transaminase-Aktivität

Versuch B 1

	Ungeschädigte Hemisphäre	Ödematöse Hemisphäre
Kontrolle	35,1 ± 2,1	34,6 ± 1,0
Insulin	36,0 ± 1,0	40,0 ± 2,8

Versuch B 2

	Ungeschädigte Hemisphäre	Ödematöse Hemisphäre
Kontrolle	36,7 ± 0,6	48,8 ± 7,3
Insulin	33,2 ± 2,2	37,3 ± 1,8

3. Beziehungen zwischen der Inkubationszeit der Schnitte und der gefundenen Enzymaktivität

3.1 Methodik der manometrischen Versuche

Diese Versuche wurden nach genau der gleichen Methodik, wie unter 1. 2 beschrieben, durchgeführt. Der einzige Unterschied bestand darin, daß nach verschiedener Inkubationsdauer jeweils ein Gefäßpaar aus dem Thermostaten genommen wurde. Die Suspensionen wurden dann in der üblichen Weise aus den Gefäßen entfernt. Schnitte und Überstand wurden voneinander getrennt.

3.2 Methodik der Inkubationen einer Sammelprobe

Bei einem Versuch (unter "Ergebnisse" als "Sammelinkubation" bezeichnet) wurde eine größere Menge in ähnlicher Weise präparierter Schnitte (entsprechend 132,3 mg Trockensubstanz) in einem Anfangsvolumen von 40 ml K-Lösung inkubiert. Es wurde ein auf 38° C temperiertes Titriergefäß des METROHM-$_p$H-Meters benutzt, das ständig mit einem schwachen Strom eines N_2-O_2-CO_2-Gemisches (75% : 20% : 5%)

begast wurde. In einen Tubus des Gefäßdeckels wurde ein engmaschiges, zylinderförmiges Sieb aus Kunststoff eingehängt. Dadurch konnten zu verschiedenen Zeiten Proben von K-Lösung entnommen werden, ohne daß sich die Menge des Schnittmaterials im Gefäß änderte. Die leicht getrübten Proben wurden vor der Untersuchung jeweils 10 Minuten bei 3ooo · g zentrifugiert.

3.3 Laktat-Dehydrogenase-Nachweis

Laktat-Dehydrogenase wurde völlig analog den anderen Enzymbestimmungen (1.3) nach folgendem Ansatz gemessen:

Test-Prinzip

$$\text{Pyruvat} + \text{NADH} + H^+ \xrightarrow{\text{LDH}} \text{L - Laktat} + NAD^+$$

Reagenzlösungen			Reaktionsgemisch
Substanz	Molarität mM	Testlösung ml	Endmolarität mM
Phosphatpuffer PH 7,5 *	50,00	2,95	46,83
Natriumpyruvat	1,04		0,98
NADH	9,00	0,10	0,29
Probe		0,10	

* In 110 ml Pufferlösung der BOEHRINGER-Originalvorschrift wurden noch zusätzlich 9 mg Natriumpyruvat gelöst. (DITTMANN, 1968)

Mess-Methode:

Es wurde 3 Minuten lang in 1-Minuten-Intervallen E gemessen. Start mit 0,10 ml Probe, anschließend Messung der Abnahme der Extinktion in 1-Minuten-Intervallen während 3 Minuten.

4. Ergebnisse der Enzymbestimmungen einer Sammelinkubation nach verschiedenen Inkubationszeiten

4.1 Allgemeines zur Darstellung der Ergebnisse

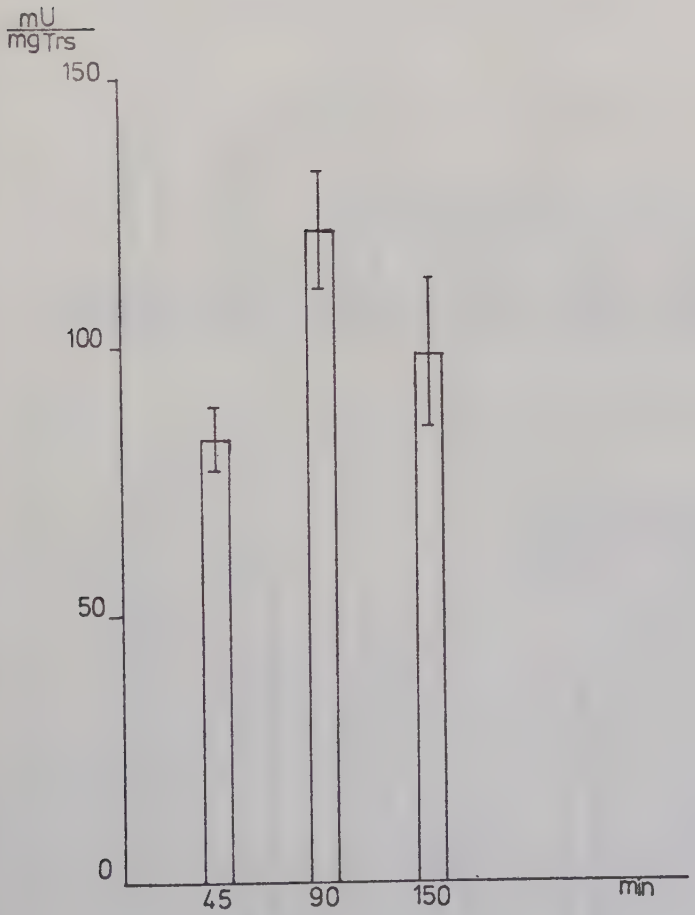
Wie unter 2.1 sind alle gemessenen Aktivitäten in "Millieinheiten pro mg Trockensubstanz" angegeben. Bei den manometrischen Versuchen handelt es sich jeweils um Doppelbestimmungen aus den zwei Proben der zusammengehörigen Gefäße eines Paares. Die gemessenen Stoffwechselgrößen dieser Versuche sind in einer anderen Arbeit (Dissertation B. HENGST) dargestellt.

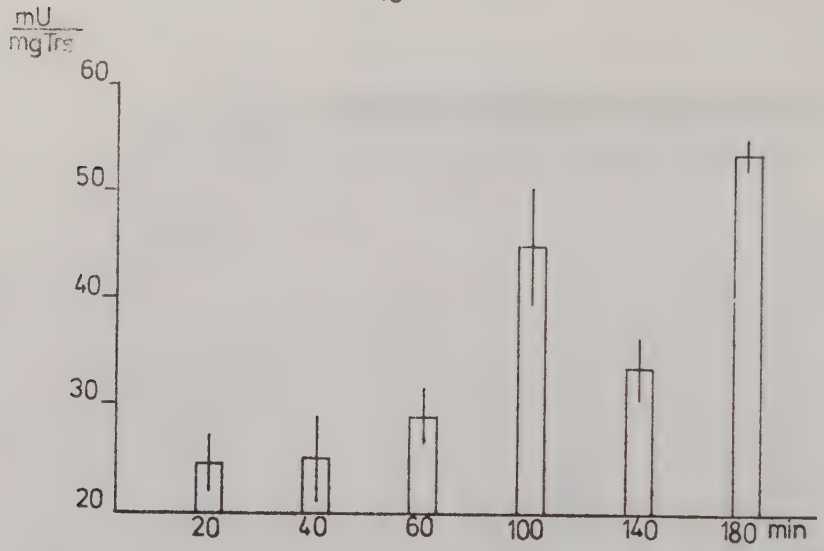
Aus der Sammelinkubation lag zu den verschiedenen Zeiten jeweils nur eine Probe vor. Sie wurde doppelt untersucht. Die gemessenen Aktivitäten sind auf die Trockensubstanz bezogen, die in der bei den einzelnen Entnahmen jeweils noch vorhandenen K-Lösung suspendiert war.

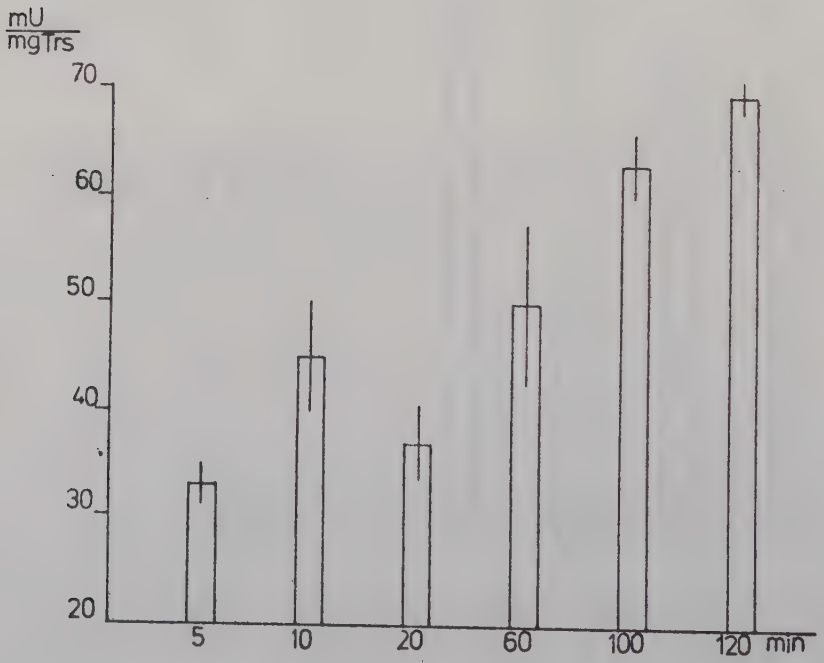
Die Ergebnisse wurden in Form von Säulendiagrammen dargestellt. Die einzelnen Werte sind auf der Abs-

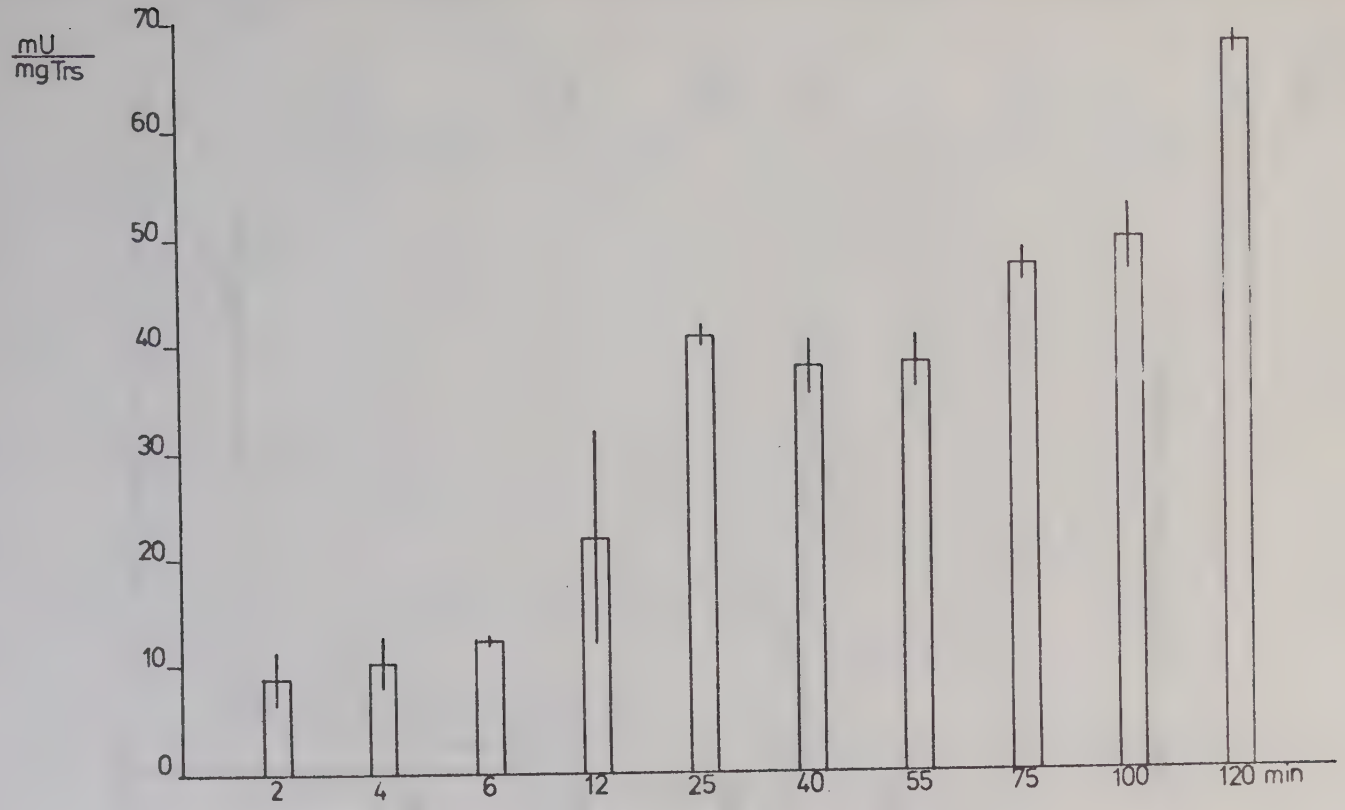
zisse lediglich in der Reihenfolge der Probenentnahmen, jedoch in zeitlicher Hinsicht nicht maßstabgerecht aufgetragen.

4.2 Laktat - Dehydrogenase - Aktivitäten

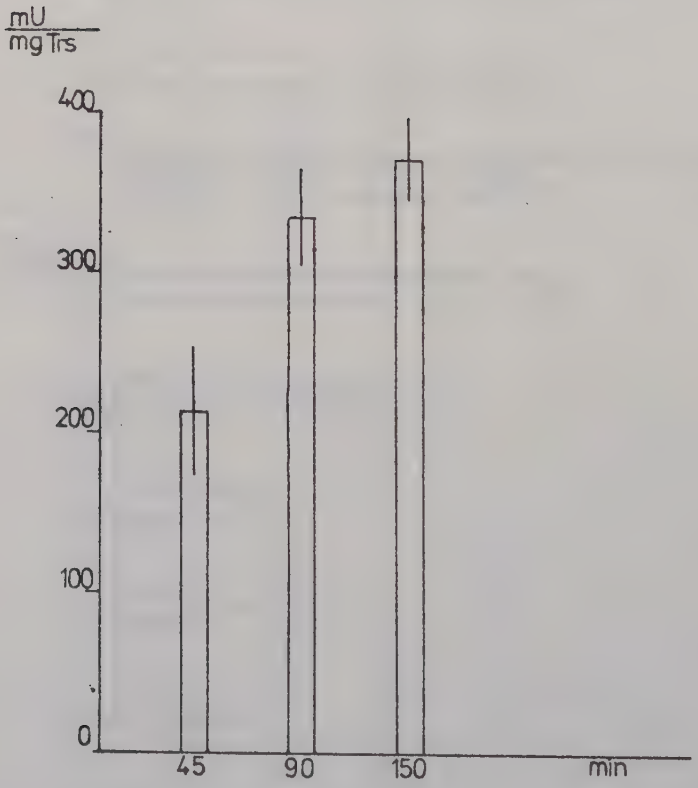


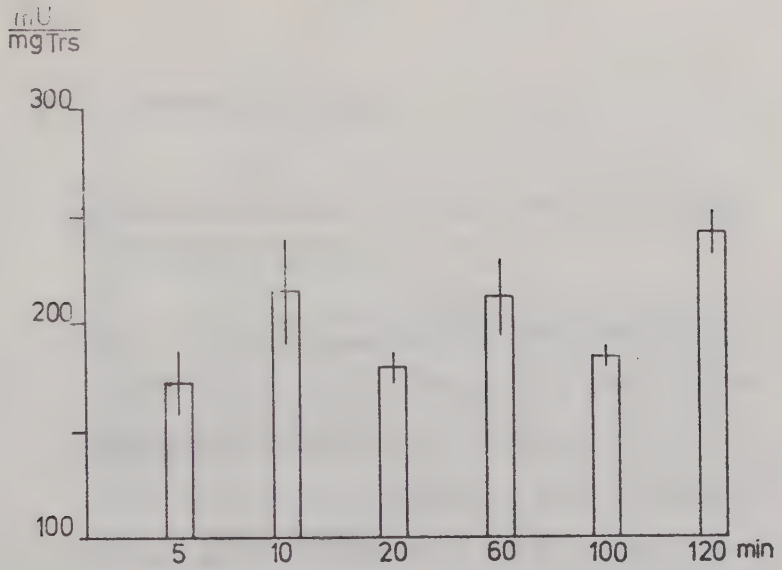

mU
mg Trs
60
50
40
30
20
20
40
60
100
140
180
min

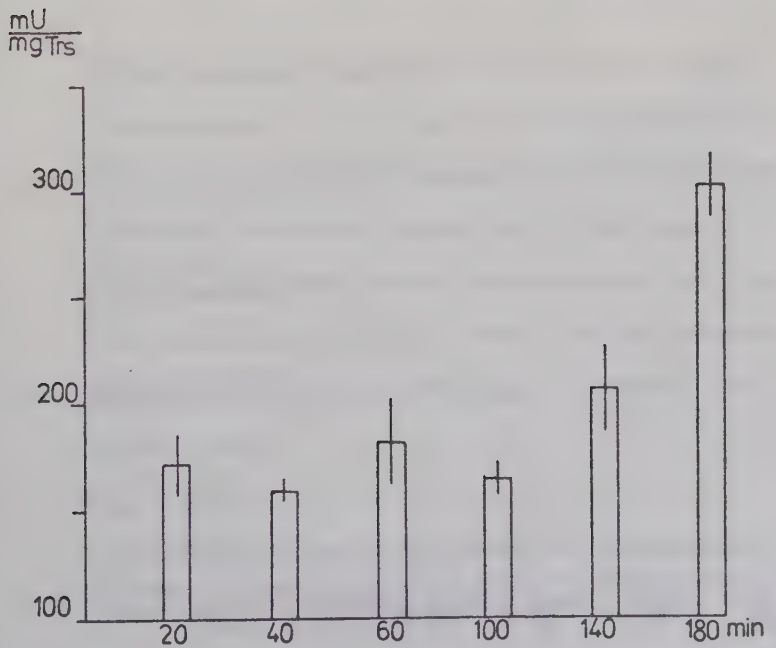

mU
mg Trs
70
60
50
40
30
20
5
10
20
60
100
120
min

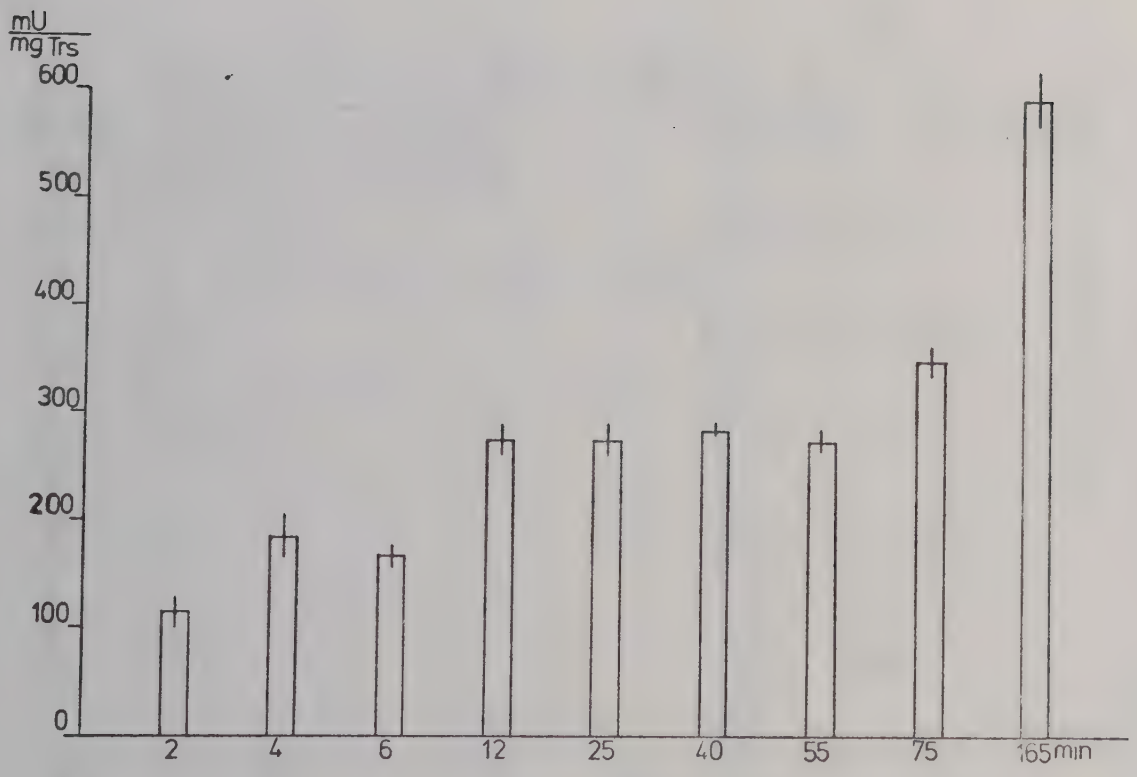

mU
mg Trs
70
60
50
40
30
20
10
0
2
4
6
12
25
40
55
75
100
120 min

43 Malat – Dehydrogenase– Aktivitäten




mU
mg Trs
300
200
100
5
10
20
60
100
120 min


mU
mg Trs
300
200
100
20
40
60
100
140
180 min


mU
mg Trs
600
500
400
300
200
100
0
2
4
6
12
25
40
55
75
165 min

III. BESPRECHUNG DER BEFUNDE

1. Vergleich der Ergebnisse mit den Enzymuntersuchungen RASMUSSENs und KLATZOs

Wie in der Einleitung ausgeführt, haben RASMUSSEN und KLATZO über charakteristische Aktivitätsänderungen der Diaphorase, Glukose-6-phosphat-Dehydrogenase und der Glycerin-1-phosphat-Dehydrogenase in der ödemgeschädigten weißen Hirnsubstanz von Katzen berichtet.

Diese Enzyme sowie die saure und die alkalische Phosphatase waren in unseren Proben nicht nachweisbar. Dies darf jedoch nicht als Widerspruch zu den Feststellungen RASMUSSENs und KLATZOs gewertet werden; wir untersuchten die Inkubationslösungen von Hirnschnitten und nicht die Schnitte selbst. Es ist denkbar, daß die genannten Enzyme nicht in löslicher Form aus den Schnitten freisetzbar sind.

In späteren Versuchen sollen daher die Bestimmungen an direkt extrahierten Hirnproben wiederholt werden.

2. Unterschiede zwischen den Enzymaktivitäten in den Inkubationslösungen gesunder und ödematöser Hirnschnitte

Die Aktivitätsdifferenzen gesund - ödematös der Cholinesterase (siehe 2.7, Versuche A 3 und A 4) sind möglicherweise interessant. Da die Unterschiede jedoch inkonstant und nicht sehr ausgeprägt sind, müssen diese ersten Hinweise später an einem breiteren Probengut überprüft werden.

Bei den Sorbit-Dehydrogenase-Bestimmungen (siehe 2.6, Versuche D 4 und D 8) verdienen die deutlich erhöhten Aktivitäten im Ödematösen besondere Aufmerksamkeit, weil sich hier für das Gebiet der Therapie vielleicht Hinweise auf eine völlig neue Indikation mit konzentrierten Sorbit-Lösungen ergeben. Eine nicht nur osmotisch sondern auch metabolisch eingreifende Therapie könnte die energetische Situation im Hirnödem verbessern und damit vielleicht zur Rückbildung von Ödemen durch Verstärkung des aktiven Transports beitragen.

3. Einfluß der beiden WARBURG-Versuchen zugegebenen Substanzen auf die Enzym-Aktivitäten

Auffällig ist die wesentlich gesteigerte NADH-Oxydation bei den Sorbit-Dehydrogenase-Bestimmungen (siehe 2.6, Versuch D 4), wo außer dem Substrat Fruktose noch Fruktose-1-phosphat vorlag, das zur Hälfte der Reaktionsgefäße der manometrischen Versuche zugegeben worden war. Fruktose-1-phosphat gehört zu den wenigen Substanzen, welche die Quellung der Hirnschnitte in vitro hemmen (DITTMANN, KLINGE).

Die übrigen bei den Versuchen zugefügten Substanzen zeigten keinen Einfluß auf die Enzymaktivitäten.

4. Abhängigkeit der Enzymaktivitäten von der Inkubationsdauer der Schnitte

Betrachtet man die Diagramme unter 4.2 und 4.3, so findet man nicht nur Unstetigkeiten im Zeitverlauf der Enzymabgabe der einzelnen Versuche, sondern auch von Versuch zu Versuch.

Dies liegt aber wohl darin begründet, daß beim Aufbrechen kleiner Gewebspartikel plötzlich die gesamten Inhaltsstoffe der Zellen an die Inkubationslösung abgegeben werden. Solche Vorgänge dürften aber während der Inkubationen nicht zu jedem Zeitpunkt in dem gleichen Ausmaß ablaufen (Unterschied zu reinen Diffusionsvorgängen). Andererseits zeigt sich bei allen Versuchen folgende allgemeine Tendenz: es ist bereits nach kurzfristiger Inkubation eine relativ hohe Aktivität von Laktat-Dehydrogenase und Malat-Dehydrogenase vorhanden. Die Aktivität wird über eine längere Zeit nicht wesentlich gesteigert, sie steigt jedoch gegen Ende aller Versuche deutlich an. Dies zeigt wahrscheinlich eine rasch

zunehmende Desintegration des Gewebes nach einer gewissen Inkubationszeit an.

Praktische Konsequenz der hier beschriebenen Befunde wird es sein, daß nach Abschluß der untereinander zu vergleichenden Versuchsserien spätere in vitro-Inkubationen mit nur 90 Minuten Gesamtdauer durchgeführt werden sollen. Möglicherweise sind auch die im Vergleich zu PAPPIUS gefundenen höheren Wassereinlagerungen während der Inkubationen nicht nur auf die unterschiedliche Art der Präparation, sondern auch auf die längere Versuchszeit zurückzuführen.

IV. ZUSAMMENFASSUNG

Es wurden die Inkubationslösungen von gesunden und ödematösen Hirnschnitten untersucht. Hierbei zeigte sich, daß gerade die von anderen Autoren (RASMUSSEN und KLATZO) innerhalb des Hirnödems in der Aktivität charakteristisch verändert gefundenen Enzyme Diaphorase, Glukose-6-phosphat-Dehydrogenase und Glycerin-1-phosphat-Dehydrogenase in unseren Proben weder auf ödematöser noch auf gesunder Seite nachweisbar waren. Es fand sich außerdem keine Aktivität der beiden Phosphatasen.

Cholinesterase zeigte in den K-Lösungen der ödematösen Hirnproben etwas niedrigere Aktivitäten als in den K-Lösungen der gesunden Vergleichsschnitte. Die Aktivitäten der Sorbit-Dehydrogenase überwogen deutlich in den K-Lösungen des ödematösen Materials.

Wurde bei den manometrischen Versuchen der K-Lösung Fruktose-1-phosphat zugefügt, so fand sich in unseren

Proben eine erhöhte Aktivität der Sorbit-Dehydrogenase.

Die Enzyme Laktat-Dehydrogenase und Malat-Dehydrogenase zeigten eine mit der Inkubationsdauer ansteigende Aktivität im Inkubationsmilieu; besonders deutlich wurde der Anstieg nach einer Inkubationszeit von 90 Minuten.

V. SCHRIFTTUMSVERZEICHNIS

1. AEBI, H.: Über die chemische und morphologische Natur der Stickstoffabgabe von Gewebsschnitten im WARBURG-Versuch. Biochim. Biophysica Acta 9, (1952): 443-456

2. ATKINSON, D. E.: Regulation of enzyme activity. Annual rev. of biochem. 35, (1966): 85-118

3. BERGMEYER, H. U.: Methoden der enzymatischen Analyse. 1. Aufl. Weinheim, 1962: 3-42 und 697-699

4. BERGMEYER, H. U.: Grundlagen und Fortschritte der enzymatischen Analyse. Zschr. anal. Chem. 212, (1965): 77

5. BUCKELL, M., CROMPTON, M. R., ROBERTSON, M. C., BARNES, G. K.: Lactate Dehydrogenase in Cerebral Cyst Fluids. J. Neurosurg. 32, (1970): 545-552

6. DAVIES-JONES, G. A. B.: Lactate dehydrogenase and glutamic oxalacetic transaminase of the cerebrospinal fluid in tumours of the central nervous system. J. Neurol. Neurosurg. Psychiat. 32, (1969): 24

7. DITTMANN, J.: Lactatdehydrogenase im Liquor cerebrospinalis bei Kindern. Optimale Substrat- und Coenzymkonzentration, Normalwert. Dtsch. Z. Nervenheilk. 192, (1968): 310-316

8. DITTMANN, J., HERRMANN, H. D., OBERMANN, U.: Examination of the Metabolism of Oedematous Brain Tissue. Acta Neurochir. (im Druck 1972)

9. DITTMANN, J., KLINGE, W.: Influence of Fructose-1,6-Diphosphate on the Water Uptake of Rabbit Brain Slices. (in preparation)

10. FRICK, E.: Über die Kreatin-Kinase im Liquor cerebrospinalis. Klin. Wschr. 19, (1967): 973-977

11. GEIGY, HRSG.: Wissenschaftliche Tabellen. 7. Aufl. Basel 1968: 634

12. HEITMANN, R., STAMMLER, A.: Änderung von Enzymaktivitäten bei der Einengung von Liquor cerebrospinalis. Klin. Wschr. 5, (1966): 273-276

13. HELLER, H., HOLSTEIN, P.: Enzymbestimmungen in Blut und Liquor bei neurologischen Erkrankungen. Z. Nervenheilkunde 28, (1970): 201-213

14. HENGST, B.: Über den Laktat- und Pyruvatstoffwechsel von Kaninchenhirnschnitten. Dissertation, med. Fakultät, Homburg/Saar (1972)

15. HERRMANN, H. D., DITTMANN, J.: Untersuchungen des Stoffwechsels von ödematösem Hirngewebe. I. Veränderung des Stoffwechsels im Kälteödem des Kaninchenhirns manometrisch in vitro gemessen. Acta Neurochir. (im Druck 1970)

16. HESS, B., BRAND, K.: Grundlagen der Bestimmung von Enzymaktivitäten. Z. analyt. Chem. 201, (1964): 125-146

17. KLUGE, H., WINKLER, G., WIECZOREK, V., VOLLHARDT, A.: Adenosindesaminase im Liquor cerebrospinalis bei neurologisch-psychiatrisch Kranken. Klin. Wschr. 47, (1969): 1268-1269

18. KLUGE, H., WIECZOREK, V., UNGER, F., GREGER, J.: Über den Ursprung und das Verhalten der OCT[1] im Liquor cerebrospinalis bei neurologisch-psychiatrischen Erkrankungen. Psychiat. Neurol., Basel 154, (1967): 88-94

19. LEHNINGER, A. L.: Supramolecular organization of enzyme and membrane systems. Z. Naturwiss. 3, (1966): 57-63

20. McILWAIN, H., RODNIGHT, R.: Practical Neurochemistry. 1. Aufl. London, Verlag Churchill 1962: 224

21. NING, J., PURICH, D. L., FROMM, J.: Studies on the kinetic mechanism and allosteric nature of bovine brain hexokinase. J. biol. chem. 244, (1969): 3840-3846

22. PAPPIUS, H. M.: Spaces in the Brain Tissue in vitro and in vivo. Progress in Brain Research. Elsevier Publishing Company, Amsterdam 29, (1967): 455-460

23. PAPPIUS, H. M.: The Distribution of Water in Brain Tissues Swollen in vitro and in vivo. Progress in Brain Research. Elsevier Publishing Company, Amsterdam 15, (1965): 135-154

24. PETTE, D.: Aktivitätsmuster und Ortsmuster von Enzymen des energieliefernden Stoffwechsels. Sonderdruck aus "Praktische Enzymologie", Verlag Hans Huber, Bern und Stuttgart, 1968: 15-52

25. RASMUSSEN, L. E., KLATZO, I.: Protein and enzyme changes in cold injury edema. Acta neuropath. (Berl.) 13, (1969): 12-28

26. SHUTTLEWORTH, E., ALLEN, N.: Early differentiation of chronic meningitis by enzyme assay. Neurology (Minneap.) 6, (1968): 534-542

27. SITZMANN, F. C.: Untersuchungen über Enzymaktivitäten im Liquor cerebrospinalis bei Kindern mit Encephalitis, seröser Meningitis und Hydrocephalus. Z. Kinderheilk. 106, (1969): 76-88

28. SCHMIDT, R. M.: Der Liquor cerebrospinalis. VEB Verlag Volk und Gesundheit Berlin 1968

29. TRAUTMANN, D.: Sind nach in vitro-Untersuchungen mit Hirnschnitten in der überstehenden Incubationslösung Glycolyse-Enzyme nachweisbar? Dissertation, med. Fakultät, Homburg/Saar (1970)

30. TSCHANKOW, T. A., DIKOW, A. L.: Isoenzyme der Fructose-Phosphat-Aldolase im Liquor cerebrospinalis bei organischen Erkrankungen des Nervensystems. Z. klin. Chem. u. klin. Biochem. 8 (1970): 33-34

31. VERREY, F.: Die diagnostische Bedeutung der Glutamat-Oxalacetat-Transaminase, der Glutamat-Pyruvat-Transaminase, der Lactat-Dehydrogenase und der Sorbit-Dehydrogenase des Liquors im Kindesalter. Enzymol. biol. clin. 2, (1962/63): 233-245

32. WARBURG, O.: Neue manometrische Zweigefäßmethode. Hoppe Seyler's Z. physiol. Chem. 348, (1967): 1677-1682

33. WARBURG, O., GAWEHN, K., GEISSLER, A. W.: Manometrie der Körperzellen unter physiologischen Bedingungen. Z. Naturforschung 12b, (1957): 115-118

34. WIECHERT, P., BRETSCHNEIDER, T.: Untersuchungen zur Peptidaseaktivität im Liquor cerebrospinalis. Dtsch. Z. Nervenheilk. 195, (1969): 26-32

35. WOLINTZ, H., JACOBS, L. D., CHRISTOFF, N., SOLOMON, M., CHERNIK, N.: Serum and cerebrospinal fluid enzymes in cerebrovascular disease. Arch. Neurol. 20, (1969): 54-61

VI. VERZEICHNIS DER ABKÜRZUNGEN

ADP	Adenosin-5-diphosphat
AP	alkalische Phosphatase
ATP	Adenosin-5'-triphosphat
CHE	Cholinesterase
CPK	Creatin-Phosphokinase
Creatin-P	Creatin-phosphat
Dihydroxyaceton-P	Dihydroxyaceton-phosphat
EDTA	Äthylendiamintetraessigsäure
GDH	Glycerin-1-phosphat-Dehydrogenase
Glukonat-6-P	Glukonat-6-phosphat
Glycerin-1-P	Glycerin-1-phosphat
GOT	Glutamat-Oxalacetat-Transaminase
G-6-P	Glukose-6-phosphat
G-6-PDH	Glukose-6-phosphat-Dehydrogenase
LDH	Laktat-Dehydrogenase
MDH	Malat-Dehydrogenase
NAD	Nicotinamid-adenin-dinucleotid
NADH	Nicotinamid-adenin-dinucleotid reduziert
NADP	Nicotin-adenin-dinucleotidphosphat
NADPH	Nicotin-adenin-dinucleotidphosphat reduziert
Nitrophenyl-P	Nitrophenyl-phosphat

P_i	anorganisches Phosphat
PEP	Phosphoenol-pyruvat
PK	Pyruvat-Kinase
SDH	Sorbit-Dehydrogenase
SP	saure Phosphatase

Lebenslauf

Am 22. 3. 1945 wurde ich als Sohn von Otto Schönberger und seiner Ehefrau Clara, geborene Wochnik, in Osburg geboren.

Ich besuchte die Volksschule in Fremersdorf und später das Staatliche Realgymnasium in Dillingen und das Städtische Realgymnasium in Saarbrücken. Am Städtischen Realgymnasium in Saarbrücken legte ich 1965 die Reifeprüfung ab. Anschließend studierte ich an den Universitäten Saarbrücken und Wien Medizin. Im Sommersemester 1971 legte ich an der Universität des Saarlandes die ärztliche Prüfung ab.

Peter M. Schönberger

Herrn Professor Dr. med. F. Loew, Direktor der Neurochirurgischen Klinik der Universität des Saarlandes, danke ich für die Überlassung des Themas und Anregung zur vorliegenden Arbeit.

Herrn Dr. rer. nat. J. Dittmann danke ich für seine Unterstützung bei der Durchführung der Versuche und der Abfassung der Arbeit.